

30. 3. 2004

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年10月 6日
Date of Application:

出願番号 特願2003-346560
Application Number:
[ST. 10/C]: [J. P 2003-346560]

出願人 財団法人神奈川科学技術アカデミー
Applicant(s): 山内 哲也

REC'D 21 MAY 2004

WIPO

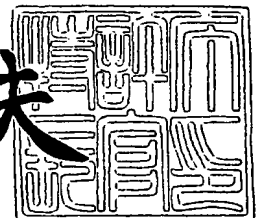
PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 4月30日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願
【整理番号】 03875
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 G01N 33/53
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県川崎市高津区坂戸 3 丁目 3 番 1-707 号
 【氏名】 伊藤 嘉浩
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都大田区千鳥 2-28-2 レゾン千鳥町 201
 【氏名】 山内 哲也
【特許出願人】
 【持分】 9/10
 【識別番号】 591243103
 【氏名又は名称】 財団法人神奈川科学技術アカデミー
【特許出願人】
 【持分】 1/10
 【識別番号】 503120106
 【氏名又は名称】 山内 哲也
【代理人】
 【識別番号】 100088546
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 谷川 英次郎
 【電話番号】 03-3238-9182
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 053235
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

基体上に所望の物質を固定化するために用いられる物質固定化剤であって、1分子中に少なくとも2個の光反応性基を有するノニオン性水溶性高分子から成る物質固定化剤。

【請求項 2】

前記ノニオン性水溶性高分子が、ポリアルキレングリコール、ポリビニル系高分子又は天然高分子である請求項1記載の物質固定化剤。

【請求項 3】

前記ポリアルキレングリコールがポリエチレングリコールであり、ポリビニル系高分子がポリ（（メタ）アクリルアミド-光反応性（メタ）アクリル酸アミド）共重合体又はポリ（グリシジル（メタ）アクリレート-光反応性（メタ）アクリル酸アミド）共重合体である請求項2記載の物質固定化剤。

【請求項 4】

前記ノニオン性水溶性高分子が、ポリエチレングリコール、ポリアクリルアミド-光反応性アクリル酸アミド）共重合体又はポリ（グリシジルメタクリレート-光反応性アクリル酸アミド）共重合体である請求項3記載の物質固定化剤。

【請求項 5】

前記光反応性基がフェニルアジド基である請求項1ないし4のいずれか1項に記載の物質固定化剤。

【請求項 6】

前記ノニオン性水溶性高分子の分子量が1万ないし500万である請求項1ないし5のいずれか1項に記載の物質固定化剤。

【請求項 7】

基体に固定化する物質が、ポリペプチド、多糖類、核酸、脂質並びに細胞及びその構成要素から成る群から選ばれる請求項1ないし6のいずれか1項に記載の物質固定化剤。

【請求項 8】

基体に固定化すべき物質と、請求項1ないし7のいずれか1項に記載の物質固定化剤とを含む水溶液又は水懸濁液を前記基体に塗布し、光照射することを含む、基体上への物質の固定化方法。

【請求項 9】

基体に固定化する物質が、ポリペプチド、多糖類、核酸、脂質並びに細胞及びその構成要素から成る群から選ばれる請求項8記載の方法。

【請求項 10】

請求項1ないし9のいずれか1項に記載の方法により前記物質が固定化された基体。

【書類名】明細書

【発明の名称】物質固定化剤、それを用いた物質固定化方法及びそれを用いた物質固定化基体

【技術分野】

【0001】

本発明は、ポリペプチド、核酸、脂質等の所望の物質を基体上に固定化するための物質固定化剤、それを用いた物質固定化方法及びそれを用いた物質固定化基体に関する。

【背景技術】

【0002】

従来より、抗体又は抗原をプレート上に固定化した、免疫測定のためのイムノプレートや、核酸をチップ上に固定化したDNAチップ等が広く用いられている。従来、基体上にタンパク質や核酸を固定化する方法の1つとして、物理吸着が広く用いられている。すなわち、例えばポリスチレンのような疎水性の基体と、基体上に固定化すべきタンパク質や核酸の水溶液とを接触させて放置することにより、物理吸着によってタンパク質や核酸が基体上に固定化される。

【0003】

しかしながら、物理吸着を用いる方法では、基体と固定化物質との結合が弱く、物質を固定化した基体の安定性が不十分であるという問題がある。また、目的のタンパク質や核酸で被覆されなかった領域への非特異吸着を防止するために、ウシ血清アルブミン(BSA)、カゼイン、スキムミルク等のタンパク質(タンパク質を固定化する場合)や、サケ精子DNA等のDNA(DNAを固定化する場合)でブロッキングすることが行われているが、ブロッキングによる非特異吸着の防止効果も必ずしも満足できるものではない。

【0004】

また、従来のバイオチップにおける生体高分子固定化は、基板上に活性エステル基を形成させ、生体高分子のアミノ基を介して結合させたり、基板上にチオール基やビオチン基を導入し、生体高分子にも各々チオール基やアビジン基を導入して固定化したりして固定化する方法もとられてきた。しかしながら、この方法では、用いる官能基が物質の活性部位の中又はその近傍にある場合には、固定化により物質の活性が失われてしまう。また、適当な官能基が存在しない場合には、この方法により固定化することができない。また、物理吸着の場合と同様、ブロッキングにより非特異吸着が防止されているが、その防止効果は必ずしも満足できるものではない。

【0005】

一方、光反応性基を利用して物質を基板に固定化することも知られている(非特許文献1)。しかしながら、この方法では、非特異吸着を防止するための配慮は特にされていない。

【0006】

【特許文献1】特開平11-337551号公報

【特許文献2】特開2001-337089号公報

【非特許文献1】Y. Ito and M. Nogawa, "Preparation of a protein micro-array using a photo-reactive polymer for a cell adhesion assay," Biomaterials, 24, 3021-3026 (2003)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

従って、本発明の目的は、基体上に種々の固定化すべき物質を共有結合により固定化することができ、かつ、非特異吸着の防止効果に優れた、物質固定化剤、それを用いた物質固定化方法及びそれを用いた物質固定化基体を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本願発明者らは、先に、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(以下、「M

PC」と言う)等のホスホリルコリン誘導体に2個以上の光反応性基を結合させた物質固定化剤を發明し、特許出願した(特願2003-93834)。この物質固定化剤を用いれば、固定化すべき物質を共有結合で基体上に固定化することができるのみならず、非特異吸着を効果的に防止できる。しかし、MPCはコストが高いという問題があり、もし、MPCと同程度の非特異吸着防止効果を有し、より低コストの物質固定化剤が得られれば有利である。

【0009】

本願發明者らは、鋭意研究の結果、ノニオン性水溶性高分子に2個以上の光反応性基を結合したものを物質固定化剤として用いることにより、MPCよりも低コストで上記目的を達成することができることを見出し本發明を完成した。

【0010】

すなわち、本發明は、基体上に所望の物質を固定化するために用いられる物質固定化剤であって、1分子中に少なくとも2個の光反応性基を有するノニオン性水溶性高分子から成る物質固定化剤を提供する。また、本發明は、基体に固定化すべき物質と、上記本發明の物質固定化剤とを含む水溶液又は水懸濁液を前記基体に塗布し、光照射することを含む、基体上への物質の固定化方法を提供する。さらに、本發明は、上記本發明の方法により前記物質が固定化された基体を提供する。

【發明の効果】

【0011】

本發明により、基体上に種々の固定化すべき物質を共有結合により固定化することができ、かつ、非特異吸着の防止効果に優れた、新規な物質固定化剤、それを用いた物質固定化方法及びそれを用いた物質固定化基体が提供された。本發明によれば、固定化すべき物質を、その種類に関係なく共有結合により固定化することができ、安定な固定化基板を得ることができる。また、本發明の物質固定化剤を用いて物質を固定化すると、非特異吸着が効果的に防止される。さらに、本發明の物質固定化剤を用いて物質を固定化する場合、選択露光を行うことにより、固定化物質のパターニングも可能であり、容易にマイクロアレイ等の任意のパターンに物質を固定化することができる。さらに、本發明の物質固定化剤は、本願發明者らが先に發明したMPCよりも低コストで製造できる。

【發明を実施するための最良の形態】

【0012】

上記の通り、本發明の物質固定化剤は、1分子中に少なくとも2個の光反応性基を有するノニオン性水溶性高分子から成るものである。

【0013】

ここで、「ノニオン性」とは、中性付近のpH (pH6~8)の水溶液中で電離してイオンになる基を実質的に有さないことを意味する。ここで「実質的に」とは、このような基を全く含まないか、又は含んでいるとしても本發明の効果に悪影響を与えない程度に微量(例えば、このような基の数が炭素数の1%以下)であることを意味する。

【0014】

本發明の物質固定化剤は、水溶性であり、水に対する溶解度(水100gに溶解するグラム数)は、好ましくは5以上である。

【0015】

ノニオン性水溶性高分子の分子量は、特に限定されないが、通常、1万~500万程度であり、好ましくは、1万~数10万程度である。

【0016】

このようなノニオン性水溶性高分子の好ましい例として、ポリエチレングリコール(PEG)やポリプロピレングリコールのようなポリアルキレングリコール;ビニルアルコール、メチルビニルエーテル、ビニルピロリドン、ビニルオキサゾリドン、ビニルメチルオキサゾリドン、2-ビニルピリジン、4-ビニルピリジン、N-ビニルサクシンイミド、N-ビニルホルムアミド、N-ビニル-N-メチルホルムアミド、N-ビニルアセトアミド、N-ビニル-N-メチルアセトアミド、2-ヒドロキシエチルメタクリレート、アクリルアミド、メタクリルアミド、N,N-ジメチルアクリルアミド、N-iso-プロピルアクリルアミド、ジアセトンアクリル

アミド、メチロールアクリルアミド、アクリロイルモルホリン、アクリロイルピロリジン、アクリロイルピペリジン、スチレン、クロロメチルスチレン、プロモメチルスチレン、酢酸ビニル、メチルメタクリレート、ブチルアクリレート、メチルシアノアクリレート、エチルシアノアクリレート、n-プロピルシアノアクリレート、iso-プロピルシアノアクリレート、n-ブチルシアノアクリレート、iso-ブチルシアノアクリレート、tert-ブチルシアノアクリレート、グリシジルメタクリレート、エチルビニルエーテル、n-プロピルビニルエーテル、iso-プロピルビニルエーテル、n-ブチルビニルエーテル、iso-ブチルビニルエーテル、tert-ブチルビニルエーテルなどのモノマー単位を単独か混合物を構成成分とするノニオン性のビニル系高分子；ゼラチン、カゼイン、コラーゲン、アラビアガム、キサンタンガム、トラガントガム、グアーガム、プルラン、ペクチン、アルギン酸ナトリウム、ヒアルロン酸、キトサン、キチン誘導体、カラギーナン、澱粉類（カルボキシメチルデンプン、アルデヒドデンプン）、デキストリン、サイクロデキストリン等の天然高分子、メチルセルロース、ビスコース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシエチルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースのような水溶性セルロース誘導体等の天然高分子を挙げることができるがこれらに限定されるものではない。これらのうち、特に好ましいものはポリエチレングリコール、ポリ（メタ）アクリルアミド（本明細書及び特許請求の範囲において、「（メタ）アクリル」は、「メタクリル」又は「アクリル」を意味する）及びポリ（グリシジル（メタ）アクリレート）であり、これらの中で特に好ましくは、ポリエチレングリコールである。なお、ポリエチレングリコールの場合、その重合度は、特に限定されないが、500～10万程度が好ましい。

【0017】

本発明の物質固定化剤では、上記したノニオン性水溶性高分子が、1分子当たり少なくとも2個の光反応性基を有する。ノニオン性水溶性高分子1分子当たりの光反応性基の数は、2個以上であれば、特に限定されるものではないが、あまりに多すぎると、非特異吸着が増大する恐れがあるので、高分子を構成する炭素数（側鎖の炭素を含まない）の10%以下が好ましく、さらに好ましくは5%以下である。光反応性基の好ましい例としてアジド基（-N₃）を挙げることができるがこれに限定されるものではない。光反応性基の具体例としてフェニルアジド基、アセチル基、ベンゾイル基が挙げられるが、特に好ましくはフェニルアジド基である。アジド基等の光反応性基は、ノニオン性水溶性高分子に直接結合していてもよいが、任意のスペーサー構造を介してノニオン性水溶性高分子に結合されていてもよく、通常、後者の方が製造が容易であり好ましい。後者の場合、スペーサー構造は、何ら限定されるものではなく、例えば炭素数1～10のアルキレン基（ただし1個又は2個のヒドロキシル基で置換されていてもよい）、フェニレン基（ただし、1～3個の炭素数1～4のアルキル基又はヒドロキシル基で置換されていてもよい）等を挙げることができる。

【0018】

ノニオン性水溶性高分子への光反応性基の導入は、常法に基づき容易に行うことができる。例えば、官能基を有するノニオン性水溶性高分子と、該官能基と反応する官能基を有するアジド化合物を反応させて、ノニオン性水溶性高分子にアジド基を結合させることができる。好ましいノニオン性水溶性高分子であるポリエチレングリコールを用いる場合、両末端にアミノ基やカルボキシル基を有するポリエチレングリコールが市販されているので、このような市販の官能基含有ポリエチレングリコールの官能基に、アジド基含有化合物を反応させてポリエチレングリコールにアジド基を結合させることができる。下記実施例にも、複数のこのような方法が具体的に記載されている。あるいは、ノニオン性水溶性高分子が水溶性ビニル系高分子のように、モノマーの重合により形成されるものである場合には、水溶性ビニル系高分子の主な構成単位となるビニル系モノマーと、光反応性ビニル系モノマーとを共重合させることにより光反応性基を有するノニオン性水溶性高分子を製造することもできる。この方法により得られる光反応性水溶性ビニル系高分子の好ましい例として、ポリ（（メタ）アクリルアミド-光反応性（メタ）アクリル酸アミド）共重合

体及びポリ（グリシジル（メタ）アクリレートー光反応性（メタ）アクリル酸アミド）共重合体等を挙げることができ、これらを製造する方法は、下記実施例に具体的に記載されている。

【0019】

本発明の物質固定化剤を用いて固定化される物質は、特に限定されないが、ポリペプチド（糖タンパク質及びリポタンパク質を包含する）、多糖類、核酸、脂質並びに細胞（動物細胞、植物細胞、微生物細胞等）及びその構成要素（核、ミトコンドリア等の細胞内小器官、細胞膜や単位膜等の膜等を包含する）を例示することができる。これらのうち、特にポリペプチドと多糖類が好ましい。本発明の物質固定化剤に光反応性基として用いられるアジド基は、光を照射することにより窒素分子が離脱すると共に窒素ラジカルが生じ、この窒素ラジカルは、アミノ基やカルボキシル基等の官能基のみならず、有機化合物を構成する炭素原子とも結合することが可能であるので、ほとんどの有機物を固定化することが可能である。

【0020】

基体としては、少なくともその表面が、用いるノニオン性水溶性高分子が有する光反応性基と結合し得る物質から成るものであれば特に限定されず、マイクロプレート等で広く用いられているポリスチレンをはじめ、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネートやポリプロピレン等の有機物から成るものを例示することができる。ガラス板にシランカップリング剤をコーティングしたもの等も用いることができる。また、基体の形態は何ら限定されるものではなく、マイクロアレイ用基板のような板状のものや、ビーズ状、繊維状のもの等を用いることができる。さらに、板に設けられた穴や溝、例えば、マイクロプレートのウェル等も用いることができる。本発明の物質固定化剤は、これらのうち、特にマイクロアレイ用に適している。

【0021】

本発明の物質固定化剤を用いて、基体上に所望の物質を固定化することは、次のようにして行うことができる。まず、基体に固定化すべき物質と、本発明の物質固定化剤とを含む水溶液又は水懸濁液を前記基体に塗布する。この場合、水溶液中の物質固定化剤の濃度（重量基準）は、特に限定されないが、通常、0.005%～10%程度であり、好ましくは0.04～1%程度である。また、固定化すべき物質の濃度（重量基準）は、通常、用いる物質固定化剤の10倍ないし200倍程度であり、好ましくは20倍ないし100倍程度である。

【0022】

次に、塗布した液を好ましくは乾燥した後、光を照射する。光は、用いる光反応性基がラジカルを生じさせることができる光であり、光反応性基としてアジド基を用いる場合には、紫外線が好ましい。照射する光線の線量は、特に限定されないが、通常、1 cm²当たり1 mW～100 mW程度である。

【0023】

光を照射することにより、ノニオン性水溶性高分子中の光反応性基がラジカルを生じ、ノニオン性水溶性高分子の少なくとも一部は基体及び固定化すべき物質の双方と共有結合する。その結果、固定化すべき物質の少なくとも一部がノニオン性水溶性高分子を介して基体に固定化される。なお、本発明の方法では、光反応性基により生じるラジカルを利用して結合反応を行うので、固定化すべき物質の特定の部位と結合するのではなく、ランダムな部位と結合する。従って、活性部位が結合に供されて活性を喪失する分子も当然出てくると考えられるが、活性部位に影響を与えない部位で結合する分子も当然存在するので、本発明の方法によれば、従来、適当な置換基が活性部位又はその近傍にあるために、共有結合で固定化することが困難であった物質であっても、全体として活性を喪失させることなく、共有結合により基体に固定化することができる。また、ノニオン性水溶性高分子上の光反応性基の数が少ない場合、全ての官能基が基体に結合する高分子も当然生じると考えられ、固定すべき物質の分子には、このような高分子に絡まる形で非共有結合的に基体に結合される分子も出現すると考えられるが、固定すべき物質の一部が非共有結合的に基体に結合されても問題はない。

【0024】

光が照射されなかった部分では、光反応性基が基体及び物質に結合しないので、洗浄すればポリマーも物質も除去される。従って、フォトマスク等を介して選択露光を行うことにより、任意のパターンで物質を固定化することができる。従って、選択露光により、マイクロアレイ等の任意の種々の形状に物質を固定化することができるので、非常に有利である。

【0025】

あるいは、本発明の物質固定化剤と、固定化すべき物質の混合物を基体上にマイクロスポッティングし、基体の全面を光照射してもよい。マイクロスポッティングは、液を基体上に非常に狭い領域に塗布する手法であり、DNAチップ等の作製に常用されており、そのための装置も市販されているので、市販の装置を用いて容易に行うことができる。あるいは、先ず、基体上に本発明の物質固定化剤を全面にコーティングし、その上に固定化すべき物質をマイクロスポッティングし、次いで基体の全面に光照射してもよい。この場合、固定化すべき物質のスポットが、物質固定化剤の層の上に形成され、物質固定化剤を介して基体に共有結合で固定化される物質の割合が高くなる。さらに、基体上に本発明の物質固定化剤をマイクロスポッティングし、その上に固定化すべき物質をマイクロスポッティングし、次いで基体の全面に光照射してもよい。この場合にも固定化すべき物質のスポットが、物質固定化剤の層（それぞれ分離したスポット）の上に形成され、物質固定化剤を介して基体に共有結合で固定化される物質の割合が高くなる。

【0026】

本発明の方法は、抗体若しくはその抗原結合性断片又は抗原を固定化した免疫測定用プレート、DNAやRNAを基板上に固定化した核酸チップ、マイクロアレイ等の作製に好適に用いることができるがこれらに限定されるものではなく、例えば、細胞全体やその構成要素の固定化等にも適用することができる。

【0027】

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【実施例1】

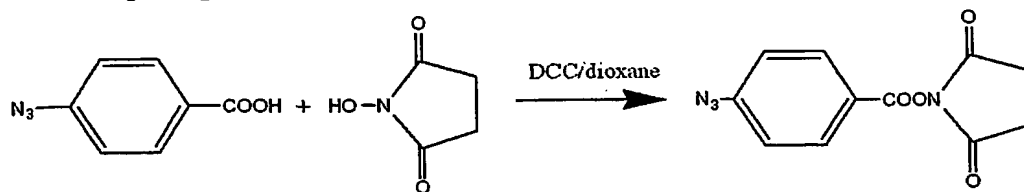
【0028】

1. 物質固定化剤の製造（その1）

(1) N-(4-アジドベンゾイロキシ) スクシンイミドの合成

【0029】

【化1】



【0030】

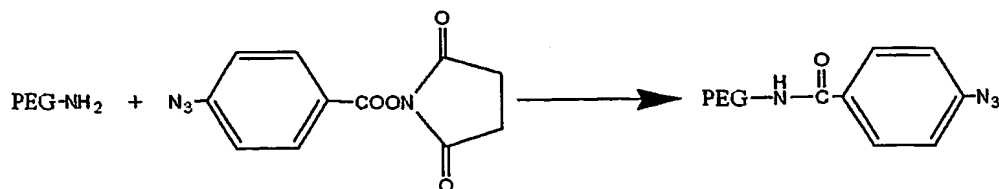
4-アジド安息香酸（東京化成（株）より市販）600mgとN-ヒドロキシスクシンイミド（和光純薬（株）より市販）420mgを1,4-ジオキサン 40mlに溶解し、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド（和光純薬（株）より市販）760mgを加えて室温で攪拌しながら反応を開始した。24時間後、副生成物をろ紙でろ去し、ろ液は減圧下で溶媒を留去した。得られた生成物は、1,4-ジオキサンとジエチルエーテルを用いて2回再結晶して精製した。その結果、675mgのN-(4-アジドベンゾイロキシ) スクシンイミドを得た（収率70.6%）。

【0031】

(2) ポリエチレングリコールへのアジド基の導入

【0032】

【化2】



【0033】

100mgのポリ（エチレングリコール）ビス（3-アミノプロピル）末端（Aldrich社より市販、平均重合度1500、以下、便宜的に「PEG-NH₂」と言うことがある）と68.6mgの(1)で製造したN-(4-アジドベンジロキシ)スクシンイミドをジメチルホルムアミド（和光純薬（株）より市販）10mlに溶解し、pH6で4℃で24時間撹拌した。反応終了後、エバポレータにより減圧下でDMFを留去し、純水を入れ、未反応物を沈殿させた。沈殿物を遠心分離により、沈降させ上清を回収し、凍結乾燥により光反応性PEG-NH₂（NH₂基は、アジド化合物との結合に消費されてもはや存在しないが便宜的にこのように記載する）を得た。

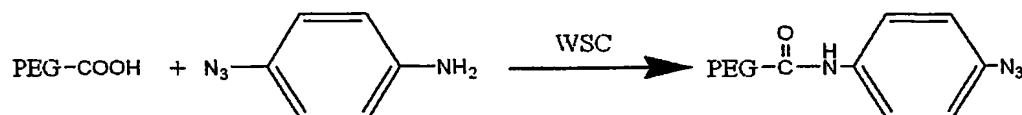
【実施例2】

【0034】

2. 物質固定化剤の製造（その2）

【0035】

【化3】



【0036】

100mgのポリ（エチレングリコール）ビス（カルボキシメチル）エーテル（Aldrich社より市販、平均重合度600、以下、便宜的に「PEG-COOH」と言うことがある）と113.3mgの4-アジドアニリンと127mgの水溶性カルボジイミドを純水10mlに溶解し、pH6で4℃で24時間撹拌した。反応終了後、水酸化ナトリウムによりpH12にし、未反応物を沈殿させた。沈殿物を遠心分離により沈降させ、上清を回収し、分液ロートにてクロロホルムで脱塩した（pHが中性になるまで繰り返した）。そして凍結乾燥により光反応性PEG-COOHを得た（COOH基は、アジド化合物との結合に消費されてもはや存在しないが便宜的にこのように記載する）。

【実施例3】

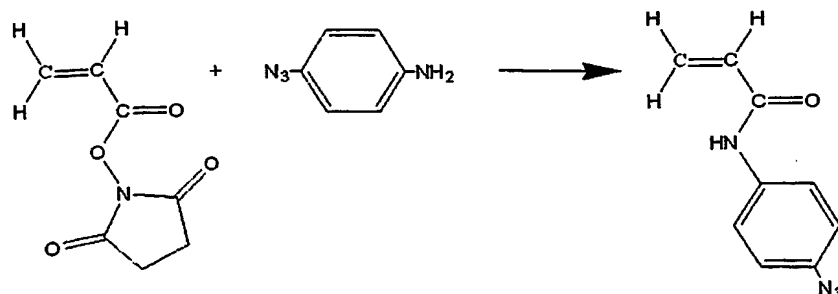
【0037】

3. 物質固定化剤の製造（その3）

(1) N-アジドフェニルアクリル酸アミドの合成

【0038】

【化4】



【0039】

4-アジドアニリン（Aldrich社より市販）341.2 mgとN-アクリロキシスクシンイミド（Aldrich社より市販）169.1mgをDMF10mlに溶解し、4℃で撹拌しながら反応を開始した。24時

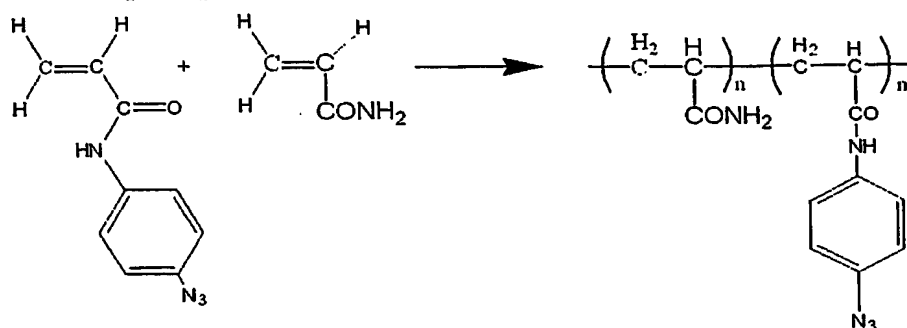
間後、再結晶により精製した。その結果、N-アジドフェニルアクリル酸アミドを得た。

【0040】

(2) 光反応性ポリ (アクリルアミド-N-アジドフェニルアクリル酸アミド) 共重合体の合成

【0041】

【化5】



【0042】

639.7mgのアクリルアミド (和光純薬市販) と160mgのN-アジドフェニルアクリル酸アミドをエタノール30mlに溶解し、重合開始剤として2,2'-アゾビスイソブリロニトリル (和光純薬より市販) を82.1mg添加し、攪拌しながら60℃で反応を開始した。5時間後、アセトンへの再沈殿により重合物を精製し、減圧乾燥により光反応性ポリ (アクリルアミド-N-アジドフェニルアクリル酸アミド) 共重合体を得た。

【実施例4】

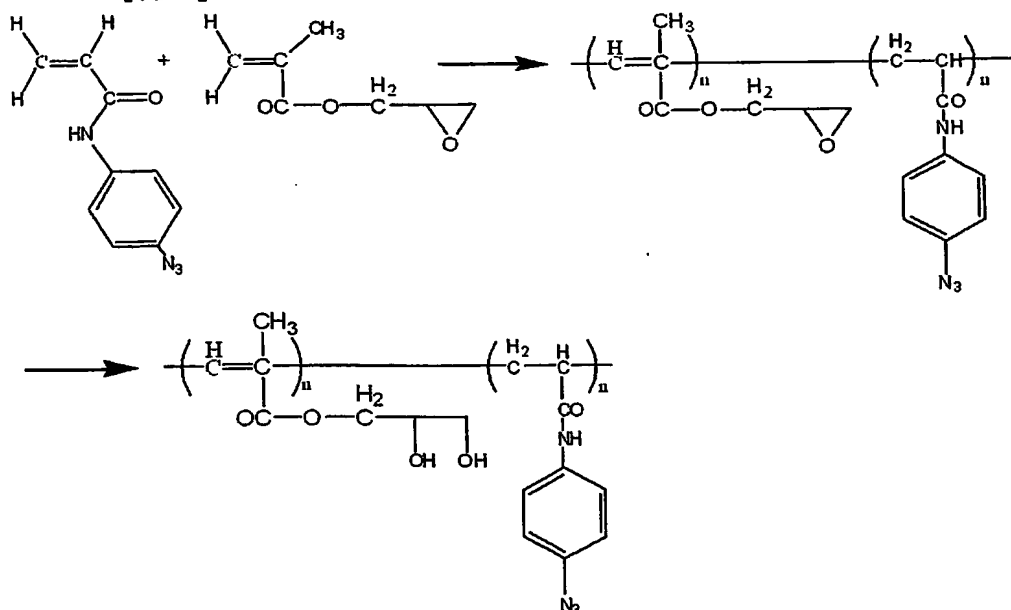
【0043】

4. 物質固定化剤の製造 (その4)

光反応性ポリ (グリシジルメタクリレート-N-アジドフェニルアクリル酸アミド) 共重合体の合成

【0044】

【化6】



【0045】

1.28gのグリシジルメタクリレート (Aldrich社より市販) と160mgのN-アジドフェニルアクリル酸アミドをメタノール30mlに溶解し、重合開始剤として2,2'-アゾビスイソブリロニトリルを16.42mg添加し、攪拌しながら60℃で反応を開始した。5時間後、ジエチルエーテルへの再沈殿により重合物を精製し、減圧乾燥により光反応性ポリ (グリシジルメタ

クリレート-N-アジドフェニルアクリル酸アミド) 共重合体を得た。水酸化ナトリウム (pH12) による処理によりエポキシ基をグリセロール化させ、水溶性とした。

【0046】

参考例1 光反応性MPCポリマーの製造

2mLのPMAc水溶液 (5wt%=50mg/mL) (PMAcは2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (90%)とメタクリル酸 (10%)のランダム共重合体で上記反応式中の化合物1)に12.44mgの4-アジドアニリンと、17.47mgの水溶性カルボジイミド(WSC)を混合し、最終的に純水で100mLにメスアップした。pH7で24時間攪拌 (冷蔵庫中4℃) し、反応終了後、透析カセット (PIERCE社製) で、外液からアジドアニリンのUV吸収がなくなるまで透析。最後に凍結乾燥し光反応性MPCポリマーを得た。この光反応性MPCを物質固定化剤として用いた場合には、非特異吸着が顕著に防止されることがFITC化タンパク質や細胞との吸着性や免疫測定により確認されている (特願2003-93834)。

【0047】

比較例1 光反応性ポリアクリル酸の製造

光反応性ポリアクリル酸は、次のように調整した。720mgのポリアクリル酸 (和光純薬社より市販、平均分子量1,000,000) と170.6mgの4-アジドアニリンと1.917gの水溶性カルボジイミドを純水100mlに溶解し、pH7.0、4℃で24時間攪拌した。反応終了後、外液からアジドアニリンのUV吸収がなくなるまで透析を行った。最後に凍結乾燥し光反応性ポリアクリル酸ポリマーを得た。

【0048】

比較例2 光反応性ポリアリルアミンの製造

比較例1の方法において、ポリアクリル酸をポリアクリルアミンに代えた同様な方法により光反応性ポリアクリルアミンを製造した。

【実施例5】

【0049】

免疫測定

(1) コラーゲン固定化基体の作製及びそれを用いた抗コラーゲン抗体の免疫測定

以下の手順により、実施例1ないし4、又は参考例1、比較例1若しくは比較例2で製造した物質固定化剤を用い、コラーゲンを固定化した基体 (ポリスチレンディッシュ) を作製し、これを用いて抗コラーゲン抗体の免疫測定を行った。

【0050】

- (i) 上記作成した光反応性PEG-NH₂ (実施例1)、光反応性PEG-COOH (実施例2)、光反応性ポリ (アクリルアミド-N-アジドフェニルアクリル酸アミド) 共重合体 (実施例3) 又は光反応性ポリ (グリシジルメタクリレート-N-アジドフェニルアクリル酸アミド) 共重合体 (実施例4) (0.125wt%) とコラーゲン (0.25wt%) を1:1で混合。
- (ii) 35mmポリスチレンディッシュに0.5μlのポリマー/コラーゲン水溶液をスポット。
- (iii) 乾燥後、UV照射 (波長260nm、照射量40mW/cm²、10秒間) により固定化。
- (iv) PBS(0.1%Tween20)で3回洗浄。
- (v) 一次抗体として抗コラーゲン抗体 (モノサン社より市販) 10倍希釈溶液 (1%BSA/PBS) 又はマウスIgG抗体 (Santa cruz biotechnology社より市販) 40倍希釈溶液 (1%BSA/PBS) をスポット状に100μl添加、室温で3時間インキュベーション。
- (vi) PBS(0.1%Tween20 (商品名))で3回洗浄後、FITC標識二次抗体 (抗ラビットIgG抗体あるいはマウスIgG抗体) (アマシャム社より市販) 20倍希釈溶液 (1%BSA/PBS) を100μl添加、室温で1時間インキュベーション。
- (vii) PBS(0.1%Tween20 (商品名))で3回洗浄後、蛍光顕微鏡にて観察。
- (viii) 比較として光反応性MPCポリマー (参考例1)、光反応性ポリアクリル酸 (比較例1)、光反応性ポリアリルアミン (比較例2) およびコントロールとして各例において物質固定化剤のみをスポットしたもので同様の操作を行った。

【0051】

(2) 結果

下記表 1 に示すように、抗コラーゲン抗体による免疫染色後、PEG-NH₂ (実施例 1) / コラーゲンスポット及びPEG-COOH (実施例 2) / コラーゲンスポット、ポリ(アクリルアミド-N-アジドフェニルアクリル酸アミド)共重合体 (実施例 3) / コラーゲンスポット、ポリ(グリシジルメタクリレート-N-アジドフェニルアクリル酸アミド)共重合体 (実施例 4) / コラーゲンスポットで蛍光が観察され、抗IgG抗体スポットでは蛍光は観察されなかった。これによりコラーゲンが特異的に染色されたことが確認できた。PEG-NH₂ (実施例 1)、PEG-COOH (実施例 2) では蛍光強度もMPCポリマー/コラーゲンスポット (参考例 1) を抗コラーゲン抗体で染色した場合とほぼ同等であり、ポリ(アクリルアミド-N-アジドフェニルアクリル酸アミド)共重合体 (実施例 3)、ポリ(グリシジルメタクリレート-N-アジドフェニルアクリル酸アミド)共重合体 (実施例 4) では約1/2の蛍光強度を示した。それに対して、負電荷のみを有する光反応性ポリアクリル酸/コラーゲンスポット (比較例 1) では、蛍光は無く、正電荷のみを有する光反応性ポリアリルアミン/コラーゲン (比較例 2) では、抗体の種類によらず非特異的な染色が起こった。以上より光反応性ポリエチレングリコールはMPCポリマーと同等にタンパク質を固定化することができ、また非特異的吸着を抑制することが明らかとなった。また、ポリ(アクリルアミド-N-アジドフェニルアクリル酸アミド)共重合体 (実施例 3)、ポリ(グリシジルメタクリレート-N-アジドフェニルアクリル酸アミド)共重合体 (実施例 4) においてもポリエチレングリコール (実施例 1、2) よりはタンパク質の固定化量は低い、固定化は可能であり、非特異的吸着も抑制することができる。

【0052】

表 1

物質 固定化剤	コラーゲン	蛍光強度	
		抗コラーゲン抗体	抗IgG抗体
実施例 1	有	932	25.5
	無	28	29
実施例 2	有	1483	55.5
	無	62	63
実施例 3	有	583	33
	無	26	28
実施例 4	有	602	29
	無	30	28
参考例 1	有	1185	33
	無	30	31
比較例 1	有	156	39
	無	44	27
比較例 2	有	82	95
	無	79	90

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 基体上に種々の固定化すべき物質を共有結合により固定化することができ、かつ、非特異吸着の防止効果に優れた、物質固定化剤、それを用いた物質固定化方法及びそれを用いた物質固定化基体を提供すること。

【解決手段】 基体上に所望の物質を固定化するために用いられる物質固定化剤は、1分子中に少なくとも2個の光反応性基を有するノニオン性水溶性高分子から成る。基体上への物質の固定化方法は、基体に固定化すべき物質と、物質固定化剤とを含む水溶液又は水懸濁液を基体に塗布し、光照射することを含む。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 3 4 6 5 6 0
受付番号	5 0 3 0 1 6 5 6 1 1 5
書類名	特許願
担当官	鎌田 枉規 8 0 4 5
作成日	平成 1 5 年 1 0 月 8 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】 平成 1 5 年 1 0 月 6 日

特願 2003-346560

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[591243103]

1. 変更年月日
[変更理由]

住 所
氏 名

1993年 5月17日

住所変更

神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2番1号
財団法人神奈川科学技術アカデミー

特願 2003-346560

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[503120106]

1. 変更年月日

2003年 3月31日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都大田区千鳥2-28-2 レゾン千鳥町201

氏 名

山内 哲也